

学位論文の要約

Zyxin modulates the transmigration of *Haemophilus influenza* to the central nervous system

(ジキシンはインフルエンザ菌の中枢神経組織への移行を調整する因子である)

Yuko Miyazaki

宮崎 裕子

Endocrinology/Diabetes and Metabolism

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 内分泌・糖尿病内科学

(Doctoral Supervisor : Yasuo Terauchi, Professor)

(指導教員 : 寺内 康夫 教授)

学位論文の要約

Zyxin modulates the transmigration of *Haemophilus influenzae* to the central nervous system

(ジキシンはインフルエンザ菌の中枢神経組織への移行を調整する因子である)

<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/viru.29786#.VUIqPmeChMs>

..... 本文

1. 序論

脳脊髄関門(BBB)は、循環と中枢神経系の間で構造的・機能的界面である。すなわち、BBBが血液感染性物質や細胞が脳へ通過するのを制御しており、神経系の微小循環におけるホメオスタシスを維持している。髄膜炎を発症するには、インフルエンザ菌がBBBを通過する必要があるが、そのメカニズムははっきりわかっていない。我々は Cell bound organisms (CBO) としてインフルエンザ菌を経鼻的に摂取することで、髄膜炎を発症するモデルマウスを用い、BBBの細胞間接着に関与するタンパクについて検討した。

2. 実験材料と方法

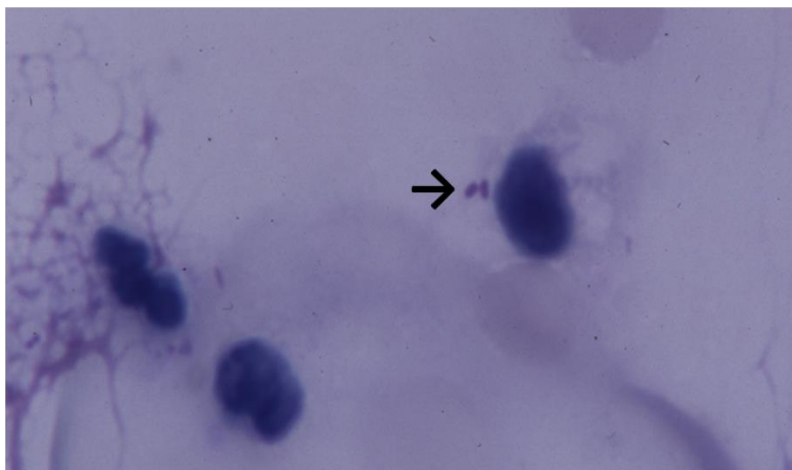
インフルエンザ菌は 770235f-b+株を用いた。CBOは4-6週齢のメス C57BL/6 マウスまたはジキシン欠損マウスの骨髄から単離した樹状細胞を用いて作成した。通過実験には Human brain microvascular endothelial cells(HBMECs)を用い、同細胞に TNF- α 処理を加えてから抽出したタンパク分画を 2 次元ゲル電気泳動し、コントロールに比べ変化のあるスポットを回収し、プロテオーム解析に用いた。脳脊髄液と脳組織サンプルは、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋切片を作製し、ギムザ染色で組織学的所見を観察した。

3. 結果と考察

HBMECs 単層培養の層を通過して侵入する CBO の数は、IL-1 β や LPS で前処理をしたものよりも TNF- α で処理したもので明らかに多かった($p < 0.001$)。さらに、CBO の侵入は TNF- α の濃度と相関しており、TNF- α 処理が BBB の通過亢進に関与することが示唆された。そこで TNF- α 処理した HBMECs から抽出した膜成分タンパクを 2 次元ゲル電気泳動し、コントロールと比較したところ、41 種類のタンパクで変化を認めた。各スポットのプロテオーム解析をしたところ、炎症に関連するタンパクなどが同定され、その中で、ジキシンが TNF- α 処理によって 1.8 倍に減少していることが明らかとなった。ジキシンは、全身のうちマクロファージと脳の細小血管内皮細胞の接着斑に発現するタンパクとして知られ、細胞の接合に重要と考えられているタンパクである。TNF- α 処理した HBMECs の RT-PCR を行ったところ、ジキシンはタンパク発現のみならず、転写発現も 1.5 倍減少して

いることが確認でき、BBBのタイトジャンクションに必要なタンパクであることが示唆された。そこでマウスを用いた感染実験を行った。野生型マウスにCBOを接種すると、接種後3-5日目に15%が髄膜炎を発症していた。また脳脊髄液には好中球だけでなく、単球内に細菌が観察された(図1)。これら髄膜炎を発症したマウスは、脳脊髄液中だけでなく肺胞にもインフルエンザ菌が確認され、中等度の肺炎を呈していた。

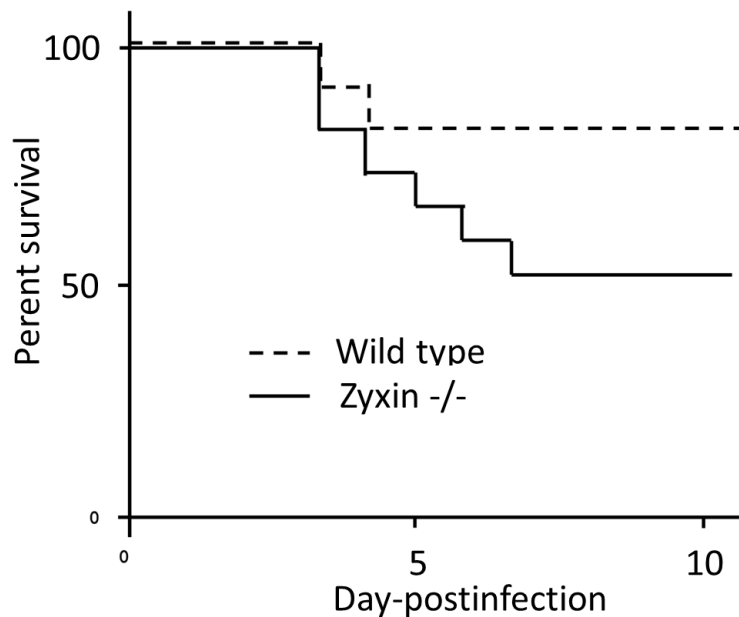
図1



この病理所見は、初感染巣（肺）で細菌が樹状細胞などの単球に侵入（細胞内に寄生）し、これがBBBに到達して、通過侵入することで髄膜炎を引き起こすのではないかと、我々の仮説を支持する所見と考えた。

そこで、ジキシリン欠損マウスにCBOを経鼻接種したところ、脳や肺における細菌濃度とは関係なく、野生型マウスに比べて明らかに致死の割合が高く（50% vs. 15%、 $p=0.03$ ）(図2)、死亡率も高かった（ハザード比 3.8）。

図2



一方で，経静脈的に生菌を接種した場合は，野生型もジキシン欠損型マウスも，観察期間中に死亡するマウスはなかった．そして，感染 24 時間後には，血中・肺や脳組織において，感染させた菌体を確認することができなかった．すなわち，細胞内寄生の状態にあることよりもさらに重要な因子が存在すると考えられるのである．

TNF- α がしばしば透過性の変化を引き起こす主要な因子となるように，障害によって引き起こされる血中のサイトカイン濃度や CSF 中の濃度と，BBB の破綻との間には密接な関係がある．実際マウス血清中の TNF- α が，経鼻接種による感染後，髄膜炎によって死亡し始める時期に増加していることも報告されている(Lv S et al.,2010)．すなわち TNF- α は，呼吸組織のような初感染巣で産生され，感染後 3 日目に検出されるようになり，血流にのって BBB に到達するようになる．そして TNF- α の経静脈的な接種をすると，BBB の透過性を亢進させることも報告されている(Takata F et al.,2011、Abraham CS et al., 1996)．この双方を考慮すると，TNF- α が髄膜炎における重要な因子であることが推測される．さらにジキシン欠損マウスは，野生型マウスに比べて明らかに死亡率が高かった．我々は，ジキシンが，細胞内寄生菌が BBB を通過侵入しようとするのに対し，BBB のタイトジャンクションを守るタンパクの一つとして重要な役割を果たしていると考えた．しかし，ジキシン欠損マウスの死亡率は 50%に到達して以降の観察期間を長くしても，それ以上の死亡率にはならなかった．これは，BBB の微小血管におけるタイトジャンクションの構成要素が， α アクチン，ビンクリン，カドヘリン，A-CAM などジキシン以外も含んでいることを考慮すると，ほかの要素の影響が関与しているものと考えている．

引 用 文 献

Abraham, CS., Deeli, MA., Joo, F., Megyeri, P., and Torrpier, G. 1996, Intracarotid tumor necrosis factor- α administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. *Neurosci Lett*, 208, 85-8.

LV, S., Song, HL., Zhou, Y., Li, LX., Cui, W., Wang, W., and Liu, P. 2010, Tumor necrosis factor- α affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in aute liver failure. *Liver Int*, 30, 1198-210.

Takata, F., Dogou, S., Matsumoto, J., Takahashi, H., Machida, T., Wakigwa, T., Harada, E., Miyaji, H., Kog, M., Nishioku, T., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. 2011, Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matric metalloproteinase-9 and migrating in vivo. *J Neuroinflammation*, 8, 106-18.

論文目録

I 主論文

Zyxin modulates the transmigration of *Haemophilus influenza* to the central nervous system

Yuko Miyazaki, Takashi Yusa, Saburo Matsuo, Yasuo Terauchi, and Shuichi Miyazaki. : Virulence Vol.5,No.6,Page 665-672, 2014

II 副論文

なし

III 参考論文

なし